

学校编码: 10384
学号: 20120051301989

分类号____密级____
UDC____



硕 士 学 位 论 文

有机锡对 HepG2 细胞的毒性效应及其机制研究
The toxic effects of organotins on HepG2 cells and their mechanisms

王礞礞

指导教师姓名: 陈 奕 欣 教授
专 业 名 称: 动 物 学
论文提交日期: 2008 年 6 月 6 日
论文答辩时间: 2008 年 7 月 24 日
学位授予日期: 2008 年 月 日

答辩委员会主席: _____
评 阅 人: _____

2008 年 月

有机锡对 HepG2 细胞的毒性效应及其机制研究

王礞礞

指导教师: 陈奕欣 教授

厦门大学

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目录

摘要.....	I
Abstract.....	III
第一章 概述	1
1.1 有机锡化合物的污染现状	1
1.1.1 三丁基锡.....	1
1.1.2 三甲基锡.....	3
1.2 有机锡化合物毒性效应的分子机制	4
1.2.1 细胞凋亡的分子机制.....	4
1.2.1.1 线粒体通路.....	4
1.2.1.2 死亡受体通路.....	5
1.2.1.3 内质网通路.....	5
1.2.1.4 其他凋亡相关酶.....	6
1.2.2 有机锡化合物对细胞凋亡通路相关蛋白的影响.....	6
1.3 本研究的目的和意义	7
第二章 材料与方法	9
2.1 材料	9
2.2 试剂与仪器	9
2.2.1 主要试剂.....	9
表 1 实验试剂.....	9
2.2.2 主要仪器.....	9
表 2 主要仪器.....	10
2.2.3 主要试剂的配方.....	10
2.3 实验方法	13
2.3.1 细胞培养.....	13
2.3.2 毒物处理.....	13
2.3.3 细胞存活率的检测.....	13

2.3.4 细胞和细胞核形态的观察.....	14
2.3.5 凋亡与坏死的比率检测.....	14
2.3.6 DNA 损伤的检测.....	14
2.3.7 ROS 水平检测.....	15
2.3.8 NOS 水平检测.....	15
2.3.9 Caspase-3, Caspase-9, Caspase-8 活性的检测.....	15
2.3.10 Western Blot 检测.....	16
2.3.10.1 样品预处理.....	16
2.3.10.2 方法.....	16
2.4 数据处理.....	16
第三章 结果.....	17
3.1 TBT 和 TMT 对 HepG2 的毒性效应.....	17
3.1.1 TBT 和 TMT 对细胞存活率的影响.....	17
3.1.2 TBT 和 TMT 对细胞形态的影响.....	18
3.1.3 TBT 和 TMT 对细胞核的影响.....	19
3.1.4 TBT 和 TMT 对细胞凋亡的影响.....	20
3.2 TBT 和 TMT 对 HepG2 的细胞毒性效应的分子机制.....	22
3.2.1 TBT 和 TMT 对 DNA 损伤的影响.....	22
3.2.2 TBT 和 TMT 对细胞凋亡相关蛋白表达和活性的影响.....	24
3.2.3 TBT 和 TMT 对凋亡相关酶活性的影响.....	29
第四章 讨论.....	31
4.1 TBT 和 TMT 对 HepG2 细胞的毒性效应.....	31
4.2 TBT 和 TMT 对 HepG2 细胞毒性效应的分子机制.....	32
4.2.1 TBT 和 TMT 对 DNA 损伤的影响.....	32
4.2.2 TBT 和 TMT 对细胞凋亡通路相关蛋白表达和活性的影响.....	33
4.2.2.1 TBT 和 TMT 对 p53 的影响.....	33
4.2.2.2 TBT 和 TMT 对 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达水平的影响.....	33
4.2.2.3 TBT 和 TMT 对细胞色素 C 的影响.....	34
4.2.2.4 TBT 和 TMT 对 caspase 的影响.....	35

4.2.3 TBT 和 TMT 对细胞凋亡相关酶活性的影响.....	36
4.2.3.1 TBT 和 TMT 对 ROS 的影响.....	36
4.2.3.2 TBT 和 TMT 对 NOS 的影响.....	37
结论.....	39
参考文献.....	41
致 谢.....	55

厦门大学博硕

CONTENTS

ABSTRACT (IN CHINESE)	I
ABSTRACT (IN ENGLISH)	III
Chapter 1.Introduction	1
1.1 Pollution status of organotins compounds	1
1.2 The toxic mechanisms of organotins compounds	3
1.1.1 Tributyltin	4
1.1.2 Trimethyltin	4
1.2.1 The mechanisms of cell apoptosis	4
1.2.1.1 Mitochondrion pathway	5
1.2.1.2 Death receptor pathway	5
1.2.1.3 Endoplasmic reticulum pathway	6
1.2.2 The effect of organotins on intracellular apoptosis-related protein	6
1.3 Purpose of thesis	7
Chapter 2 Materials and methods	9
2.1 Materials	9
2.2. Reagents and experiment instruments	9
2.2.1 Main reagents	9
2.2.2 Main instruments	9
2.2.3 Main reagent formula	10
2.3 Experiment methods	13
2.3.1 Cell culture	13
2.3.2 Drug treatment	13
2.3.3 Detection of cell viability	13
2.3.5 Detection of apoptotic and necrotic cells	14
2.3.4 Morphology of cell and nuclear	14

2.3.6 Detection of DNA damage.....	14
2.3.7 Detection of ROS level.....	15
2.3.8 Detection of NOS level.....	15
2.3.9 Detection of caspase-3,8,9 activity	15
2.3.10 Detection of Western Blot.....	16
2.3.10.1 Pretreatment of protein samples.....	16
2.3.10.2 Methods.....	16
Chapter 3 Result	17
3.1 The toxicity of TBT and TMT on HepG2 cells.....	17
3.1.4 The effect of TBT and TMT on cell apoptosis.....	17
3.1.2 The effect of TBT and TMT on cell morphology	18
3.1.3 The effect of TBT and TMT on nuclear.....	19
3.1.1 The effect of TBT and TMT on cell viability	20
3.2 The toxic mechanisms of TBT and TMT on HepG2 cells	22
3.2.1 The effect of TBT and TMT on DNA damage.....	22
3.2.2 The effect of TBT and TMT on intracellular apoptosis-related proteins ..	24
3.2.3 The effect of TBT and TMT on apoptosis-related enzymes	29
Chapter 4 Discussion	31
4.1 The toxicity of TBT and TMT on HepG2 cells.....	31
4.2 The toxic mechanisms of TBT and TMT on HepG2 cells	32
4.2.1 The effect of TBT and TMT on DNA damage.....	32
4.2.2.2 The effect of TBT and TMT on Bcl-2 and Bax expression	33
4.2.2.1 The effect of TBT and TMT on p53 expression	33
4.2.2 The effect of TBT and TMT on intracellular apoptosis-related proteins ..	33
4.2.2.3 The effect of TBT and TMT on cytochrome c	34
4.2.2.4 The effect of TBT and TMT on caspase activity	35
4.2.3 The effect of TBT and TMT on apoptosis-related enzymes	36
4.2.3.1 The effect of TBT and TMT on ROS level	36
4.2.3.2 The effect of TBT and TMT on NOS level.....	37

Conclusions	39
References	41
Acknowledgements	55

厦门大学博硕

摘要

有机锡是目前使用最为广泛的有机金属之一。有机锡在农业和工业方面的广泛应用是其在环境中积累的主要原因,尽管它的应用带来了巨大的经济效益,但是随之而来的环境问题也越来越突出。三丁基锡 (Tributyltin, TBT) 和三甲基锡 (Trimethyltin, TMT) 都属于有机锡家族,它们的毒性已经在很多细胞中得到了证实。但 TBT 和 TMT 细胞毒性效应的分子机制还没有完全阐述清楚。本实验用 TBT (0.5, 1, 2, 4 μM) 和 TMT (4, 8, 16, 32, 64 μM) 处理 HepG2 细胞,分析其对 HepG2 细胞的毒性效应,并对其诱导 DNA 损伤、对凋亡相关酶和蛋白进行分析,结果如下:

1.TBT 和 TMT 对 HepG2 细胞的毒性。

通过 MTT 实验,发现 TBT 和 TMT 可以显著的抑制 HepG2 细胞的存活率,而且这种影响呈明显的剂量效应。进一步的相差显微镜观察发现:处理组的细胞形态发生明显的变化:细胞的贴壁率明显降低,胞间连接被破坏。Hoechst 33342 荧光染色实验和流式细胞仪实验的结果表明:TBT 和 TMT 均会诱导 HepG2 细胞发生凋亡,而且呈现出明显的剂量效应。但总的说来,TBT 的细胞毒性要比 TMT 的强,主要表现在 0.5 μM 的 TBT 处理 3 h 就可显著性地降低 HepG2 细胞的存活 ($p<0.05$),而 64 μM 的 TMT 处理 24 h 才表现出类似的结果。

2.TBT 和 TMT 对 HepG2 细胞 DNA 损伤的影响。

通过彗星实验发现,经 TBT 和 TMT 处理后的 HepG2 细胞,其彗尾的长度 (Tail Length)、尾部 DNA 百分率 (Tail DNA%) 和尾矩 (Tail Moment) 均随处理浓度的增高而增加,显示出明显的剂量效应。对细胞内活性氧 (ROS) 水平检测的结果发现:TBT 和 TMT 处理后的 HepG2 细胞内 ROS 水平随处理浓度的增高而升高,4 μM 的 TBT 处理 3 h 后细胞内 ROS 水平与对照组差异显著($p<0.05$),认为 TBT 和 TMT 诱导的 DNA 损伤与胞内 ROS 水平的变化有关。

3.TBT 和 TMT 对细胞内凋亡相关因子的影响。

对 TBT 和 TMT 处理后细胞内凋亡通路相关蛋白的 Western blot 的检测结果表明:胞浆中细胞色素 C 的表达水平随处理浓度的增加而升高,Bax/Bcl-2

的比值也随 TBT 和 TMT 浓度的增加而升高，而与凋亡相关的 p53 蛋白表达水平没有变化。对细胞内凋亡相关的 caspase-3, 8, 9 活性的检测结果显示，caspase-3 的活性均随 TBT 和 TMT 处理浓度的增加而升高；Caspase-8 和 caspase-9 的活性随 TBT 处理浓度的增加而升高，而 TMT 对 caspase-8 的活性影响是先升高后降低、对 caspase-9 的活性影响并不明显。这些结果说明线粒体凋亡通路和死亡受体凋亡通路都参与了 TBT 的凋亡诱导，而 TMT 则以死亡受体通路为主。

关键词：有机锡；HepG2 细胞；凋亡；

Abstract

Organotin compounds are among the most widely used organometallic compounds. Their accumulation in environment is due to their wide use in agricultural and industrial applications. The toxicity of tributyltin (TBT) and trimethyltin (TMT) have been confirmed in many cells. But the molecular mechanism of their toxicity has not elucidated clearly. In the present study, we treated HepG2 cells with TBT (0.5, 1, 2 and 4 μM) and TMT (4, 8, 16, 32 and 64 μM), investigated their toxic effects on HepG2 cells and analyzed the DNA damage induced by them and the apoptosis-related proteins and enzymes, the results are as follows:

1. The toxicity of TBT and TMT on HepG2 cells

In MTT experiment, we found that the viability of HepG2 cells treated with TBT or TMT was inhibited in a concentration-dependent manner. The cell morphology was changed, including cell adhesion rate decreased significantly and the intracellular connections were destruct. The results of Hoechst 33342 staining and flow cytometry experiments indicated that TBT and TMT could induce apoptosis and the apoptotic rate was concentration-dependent manner. But overall, the cytotoxicity of TBT is higher than that of TMT. It is reflected primarily that the viability of cells treated with TBT 0.5 μM for 3 h can be significantly inhibited ($p < 0.05$), while we obtain the similar result with TMT 64 μM for 24 h.

2. The effect of TBT and TMT on DNA damage

In the comet assay experiment, we found that the tail length, tail DNA% and tail moment of HepG2 cells treated with TBT and TMT were all increased with the elevation of concentrations, there was an obvious concentration-dependent. From the results of the intracellular ROS levels detection, we observed the ROS levels in treated groups were increased with the elevation of the concentration of TBT and TMT and there was an obvious difference between 4 μM TBT treated group and the control group ($p < 0.05$). It suggested that the DNA damage induced by TBT and

TMT has association with the change of intracellular ROS levels.

3. The effect of TBT and TMT on intracellular apoptosis-related proteins

The results of the Western blot of intracellular apoptosis-related proteins treated by TBT and TMT suggested that the levels of cytochrome C and the ratio of Bax and Bcl-2 were increased as the concentration of TBT and TMT increased, but the p53 was not concerned. The results of caspase-3, 8 and 9 activities indicated that the caspase-3 activity was increased with the concentration of elevation of TBT and TMT. In TBT treated groups the caspase-8 and 9 activities were increased with the contentration of elevation of TBT, but in the TMT treated groups, the caspase-8 activity was first increased then decreased and the caspase-9 activity was not evident. All these results indicated that both mitochondrial pathway and death receptor pathway take part in the TBT-induced apoptosis, while TMT induced apoptosis mainly through the death receptor pathway.

Keyword: Organotins; HepG2 cells; Apoptosis.

第一章 概述

1.1 有机锡化合物的污染现状

有机锡化合物可以分为 4 种类型：四烷基锡化合物 (R_4Sn)、三烷基锡化合物 (R_3SnX)、二烷基锡化合物 (R_2SnX_2) 和一烷基锡化合物 ($RSnX_3$)，以上通式中 R 可为烷基、烷基或芳基等；X 为无机或有机酸根、氧或卤族元素等^[1]。

有机锡化合物的大规模使用始于 20 世纪中期，当时主要用于塑料工业生产的稳定剂和催化剂。后来随着使用范围的不断扩大，各种有机锡化合物的产量也在不断提高。在工业有机金属化合物生产中，有机锡化合物的产量排行第 4^[2]。大量的有机锡化合物被用在工业、农业、各种杀虫剂、除草剂、纺织品防霉以及海洋船只防污涂料中^[3]。据估计，全世界目前用作 PVC 稳定剂的有机锡化合物约为 23,000 吨，占有机锡化合物总产量的 40%；用于农用杀虫剂的有机锡化合物约占总有机锡化合物的 30%；而用于海洋船只防污的有机锡化合物约为 3000 吨^[2]。有机锡化合物的使用给各个国家带来了巨大的经济效益，但与此同时，有机锡化合物的负面效应也越发突显出来。最早的研究发现海洋生物对有机锡化合物有很强的富集能力，蓄积系数大约在 5000-10000 之间^[1, 4]。因此，在浓度很低的情况下就能引起海洋鱼类等的累积性中毒并引起可怕的生殖逆向性变化，致使出现雄多雌少的情况，威胁到它们族群生存^[5]。随后的研究发现有机锡化合物可以通过呼吸道、消化道和皮肤粘膜而富集于机体^[6]，抑制水体动物和哺乳动物的免疫系统，使它们对疾病增加易感性^[7]。而被有机锡化合物污染的食物和用品是人体有机会吸收有机锡的主要原因^[8, 9]。因此关于有机锡毒性的研究成了目前关注的热点。

而在所有的有机锡化合物中，三丁基锡 (Tributyltin, TBT) 和三甲基锡 (Trimethyltin, TMT) 的应用最为广泛。

1.1.1 三丁基锡

三丁基锡是所有有机锡化合物中应用最多、效果最强的一类^[10]。大量的研究证明 TBT 对动物和人类的神经系统，生殖系统，免疫系统，呼吸系统和消化

系统都有毒性作用^[11, 12]。

TBT 能使生物体神经系统在分子和细胞水平发生形态上的改变, 也影响神经递质, 甚至对动物的行为产生影响^[13]。TBT 还能引起星形胶质细胞死亡和海马细胞大量死亡, 对海马细胞的毒性作用与自由基, 尤其是活性氧 (Reactive oxygen species, ROS) 有关^[13]。TBT 染毒后大鼠脑重量尤其是小脑明显减轻, 新出生的大鼠即使暴露于较低浓度的 TBT 也会对神经系统发育造成损害^[13]。TBT 能抑制神经递质生成, 对大鼠的行为产生影响, 如选择对母体无毒性的剂量进行实验, 发现染毒组后代较为兴奋, 在空间能力学习方面 (如迷宫、游泳) 显示出明显的迟钝^[14]。

TBT 具有内分泌干扰特性, 是造成贝类畸形、牡蛎发育异常、腹足类动物性畸变的最主要因素之一^[15]。TBT 的内分泌干扰作用对哺乳动物的生殖也具有一定的影响。在雌性大鼠二代繁殖实验发现 TBT 使母鼠产仔和幼鼠成活率明显下降, 幼鼠睁眼时间延迟, 性成熟后雄鼠发情周期延长, 雌鼠阴道开放时间延后等, 并有雄性化趋势。雄鼠进行同一实验发现睾丸和附睾重量明显低于正常组, 且生精细胞和精子计数也明显低于正常组, 血浆雌二醇浓度明显下降^[16]。TBT 使大鼠怀孕后期流产及仔鼠体型及体重减小, 雄性幼鼠生殖器和肛门距离减小, 在高剂量下, 可观察到幼鼠骨骼发育异常, 母鼠血液甲状腺素水平明显降低, 提示母鼠的甲状腺激素可能在 TBT 的生殖毒性中起着重要的作用^[17]。Ema 等^[18, 19]发现孕鼠在怀孕早期 (7-9 d) 接触 TBT, 流产率明显高于怀孕晚期 (13-15 d), 而在怀孕中期 (10-12 d) 接触 TBT, 幼鼠的畸形率最高, 说明胚胎在器官形成期对 TBT 最敏感。

TBT 对哺乳动物的胸腺细胞、淋巴细胞等有明显损害作用。大鼠接触 TBT 后, 胸腺明显萎缩, 病理分析发现染毒大鼠胸腺皮层细胞损伤, 胸腺细胞染色体碎片和染色质浓缩, 同时观察到明显的细胞凋亡现象。Tryphonas 等^[20]通过对大鼠, 妊娠 8 d 起在孕期、哺乳期和幼鼠等各个发育阶段用橄榄油经口分别给予 0.025、0.25 和 2.5 mg/kg 的 TBT, 给药 7 d, 研究发现 TBT 使大鼠自然杀伤细胞、T 淋巴细胞和血清 IgM、IgG 水平均发生变化, 同时观察到胸腺萎缩, 表明其对体液和细胞免疫等产生了影响。而且 TBT 可以抑制人体自然杀伤细胞的作用, 阻止它们对肿瘤细胞的攻击^[20]。

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕